２１．　走査型電子顕微鏡(SEM)で見た生物の世界

実践学校教育講座
出野卓也

電子顕微鏡の必要性

小さなものを拡大して観察するために、私たちは光学顕微鏡を用います。その倍率は対物レンズと接眼レンズの倍率をかけ合わせたものになりますので、例えば 100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを使えば総合倍率が 1000 倍となります。これをさらに顕微鏡 TV カメラなどによってモニター上で拡大してやれば、もっと倍率の大きな像が簡単に得られるような気がしますが、実際には実用的ではありません。総合倍率は、せいぜい 1000～1500 倍くらいが限界です。なぜなら、小さな構造を見るためには何倍に拡大できるかも重要なのですが、それ以上に重要なのが対物レンズの分解能（どれだけ接近した二点を見分けることができるか）だからです。対物レンズの分解能が低ければ、どれだけ拡大してもぼやけた像を拡大しているだけになります。

分解能（d）は次の式で決まります：

$$d = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin\alpha} \quad \text{・・・式（１）}$$

ここでλは光の波長、n は標本とレンズとの間の空間の屈折率、αはレンズに入る光の最大開口角度です。この式（１）では分母を大きくするか、分子を小さくすれば、dが小さくなります。分母については、現実的には n は油浸レンズ用オイルを使っても 1.5 程度、$\sin\alpha$は最大でも 1 ですので、1.5 より大きくすることは困難です。ちなみに、分母である$n \cdot \sin\alpha$は開口数(N.A.)といってレンズの性能を示す値で、ちゃんとした対物レンズなら記載されています。

一方、分子は波長λが短いほど小さくなり、分解能が上がるのですが、私たちの見ることのできる光（可視光）の波長が決まっていますので、限界があります。仮に開口数 1.5 の対物レンズを用いて 400nm の波長の光で観察しても、分解能は約 0.27μm

となります。これ以上接近している二点を識別できないのですから、拡大してもあまり意味のない像となるわけです。

しかし、光の代わりに波長の短い電子線を使うと、この分解能を飛躍的に上げることができます(表１)。電子線を波と考えた場合の波長λ(nm)は次の式で決まります：

$$\lambda = \sqrt{\frac{1.5}{V}} \quad \text{・・・式(２)}$$

この式(２)で、Vは電子線源の加速電圧です。Vを上げるとλは光の波長よりずっと短くなります。光学顕微鏡のシステムを電子線のシステムに置き換えた透過型電子顕微鏡(TEM)では、加速電圧が1,000,000V を越える TEM もありますので、この場合、λは 0.0012nm になります。しかし、光学レンズと比べて電磁レンズでは収差などの補正が十分できないので、実際には分解能は計算通りに上がりません。それでも分解能は約 0.2nm(0.0002μm)と 1000 倍以上も良くなります(図１の超高圧電子顕微鏡は加速電圧 300 万 V で分解能は 0.14nm)。そのため、光学顕微鏡では 1000～1500 倍が総合倍率の限界でしたが、TEM では理論的にその 1000 倍の 100 万倍まで拡大しても意味のある像となります。また、電子線による像は肉眼で見えませんので、蛍光板や専用の CCD カメラを使う必要があります。

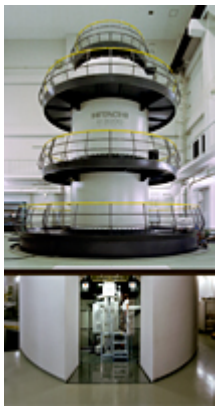

図１　大阪大学超高圧電子顕微鏡(阪大 HP より)

表１　光学顕微鏡・透過型電子顕微鏡・走査型電子顕微鏡の比較

特徴・性能	光学顕微鏡	TEM	SEM
分解能	0.2～0.1μm	1～0.2nm	10～3nm
焦点深度(500 倍で)	浅い (2μm)	中程度 (500μm)	深い (1000μm)
視野	大きい	小さい	大きい
色彩	あり	なし	なし
試料の状態	大気中(or 水中)	真空下	真空下
透過可能厚	厚い	極めて薄い	薄い
試料作製技術	容易	複雑 熟練を要す	容易(非生物) 複雑(生物など)

走査型電子顕微鏡(SEM)で像が見える仕組み

今回使う走査型電子顕微鏡(SEM)は、双眼実態顕微鏡あるいは解剖顕微鏡に相当する電子顕微鏡で、標本の表面構造を立体的に観察できる装置です。TEM ほど分解能は高くありませんが、同時にピントが合う焦点深度が光学顕微鏡よりもずっと深く、全

体にピントの合った像を観察できます(表１)。また、試料作成や操作も透過型電子顕微鏡に比べてはるかに容易ですので、簡単に習得できます。

真空中で細く絞った電子ビームを試料に照射すると、試料表面から二次電子や反射電子、特性Ｘ線などが出てきます(図２)。これらのシグナル強度は、電子ビームの照射された試料表面の構成元素や立体構造の影響を受けます(図３)。そこで、電子ビームで試料表面を走査し、そのシグナル強度をモニター上の同じ座標の画素の輝度に変換すると、シグナル強度の差がコントラストとなって、試料表面の立体構造や元素組成を反映した像が得られます(図４)。このとき、電子ビームで走査する面とモニター上で走査する面のサイズの比が倍率になります(図４)。画像生成の仕組みは光学系で見るとレーザー共焦点顕微鏡に似ています。

特に金などの金属コーティングをして試料表面の組成を均一にし、電子ビームで走査して微小な領域から出る二次電子を捉えると、試料表面の凹凸を反映した高分解の凹凸像を得ることができます。これが一般に SEM 像と呼ばれている画像です。また、反射電子をとらえると、凸凹像や組成像を得ることもできます。特に低真空 SEM 装置では、反射電子の情報を利用します。低真空 SEM 装置は試料の乾燥が不十分でも観察できますので、生物試料を観察する上で便利です。

SEM の場合、分解能は試料に照射した電子ビームのスポット径で決まります。スポット径が小さいほど分解能が上がります。スポット径はレンズ系の総合倍率や光源の大きさ、レンズ系の球面収差、色収差、回折収差などで決まりますが、一般的な汎用 SEM で数 nm 程度まで絞ることができます。

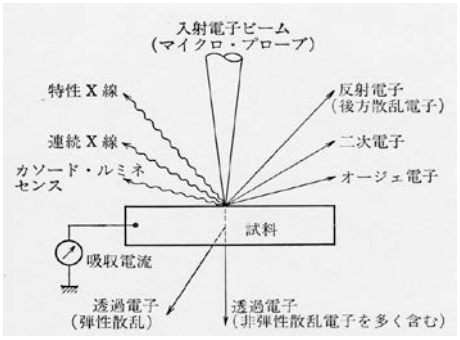

図２ 電子ビームを試料表面に当てると得られる情報(文献１より)

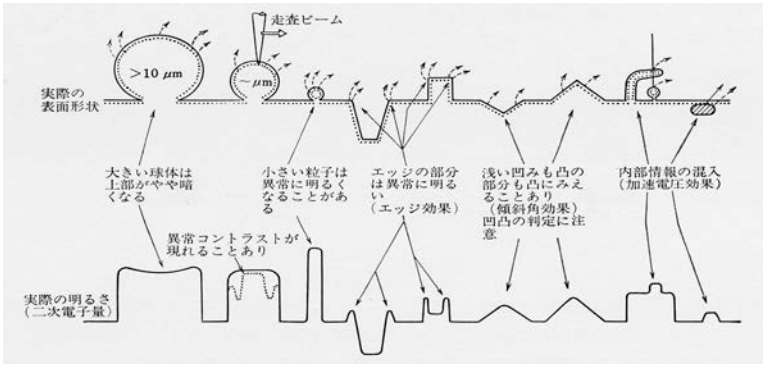

図３　試料表面の凹凸と二次電子量の関係(文献１より)

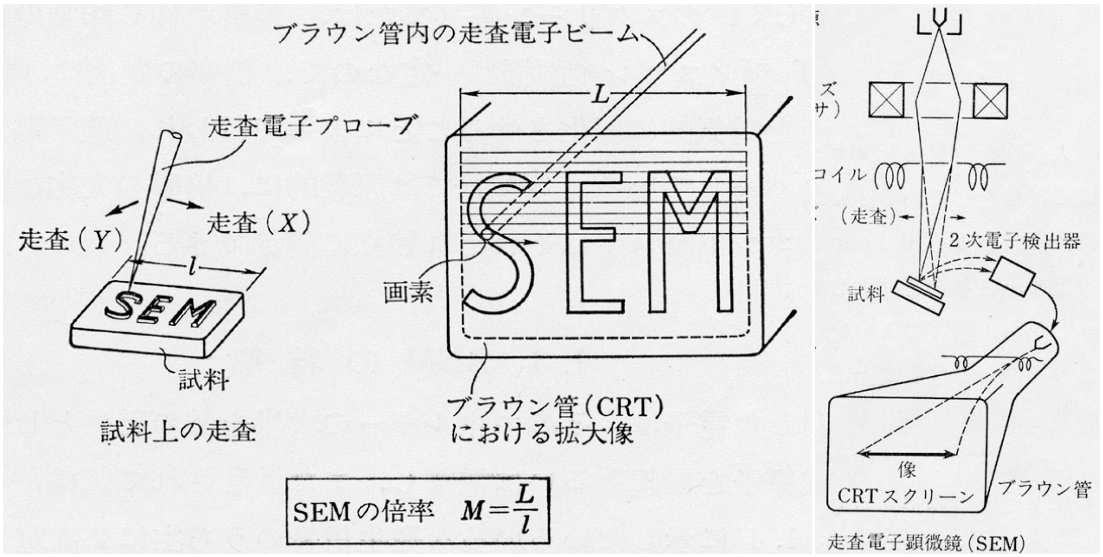

図４　ＳＥＭの像形成と倍率(文献２より)

卓上型走査型電子顕微鏡 Mighty-8DX の使い方

今回使ってもらう走査型電子顕微鏡は㈱テクネックス工房の製品で、Mighty-8DX という大変小型の SEM です。これでも最高加速電圧 17kV、最高倍率 100,000 倍、最高分解能約 10nm と、生物試料には十分な性能があります。図５は平成 21 年 12 月に導入された壱号機です。左側が鏡筒部で、右のモニターの下が制御部です。鏡筒部から左に伸びるチューブの先に小型の真空ポンプがあります。

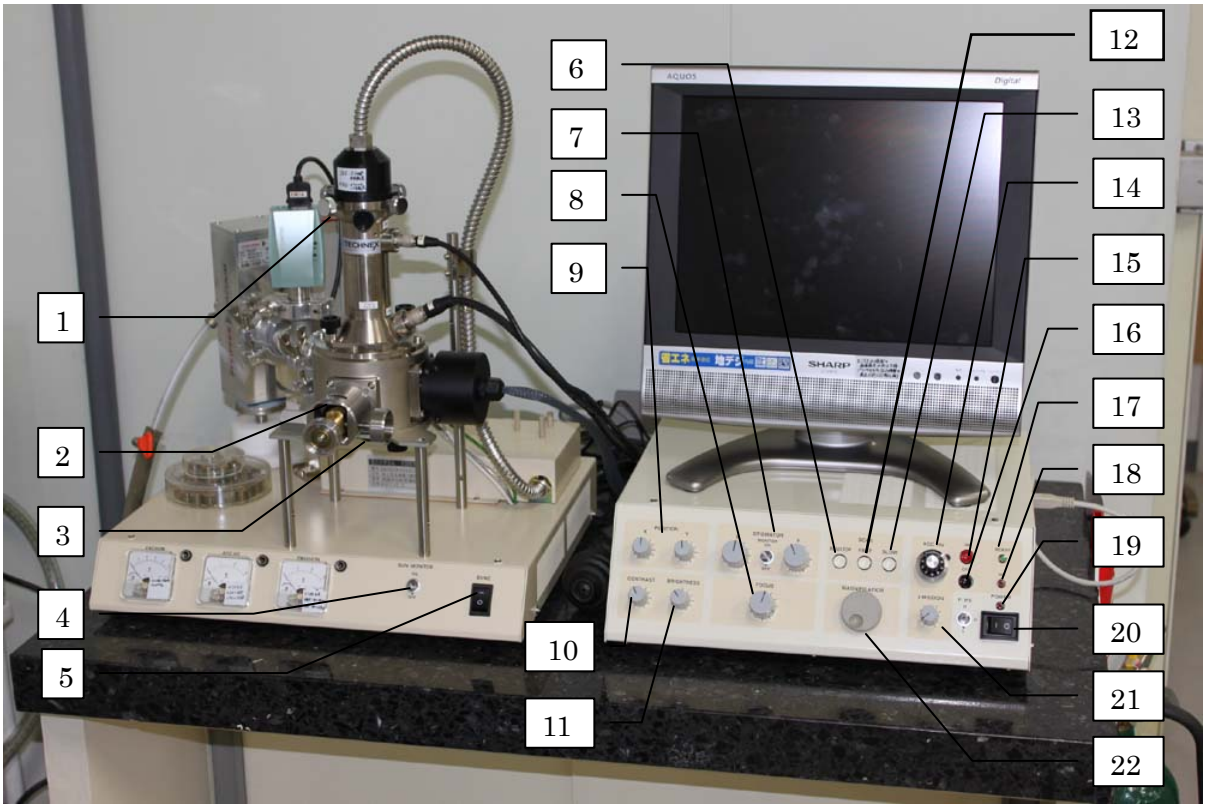

図５　Mighty-8DX 壱号機と本冊子でのスイッチ・つまみ等の番号表示

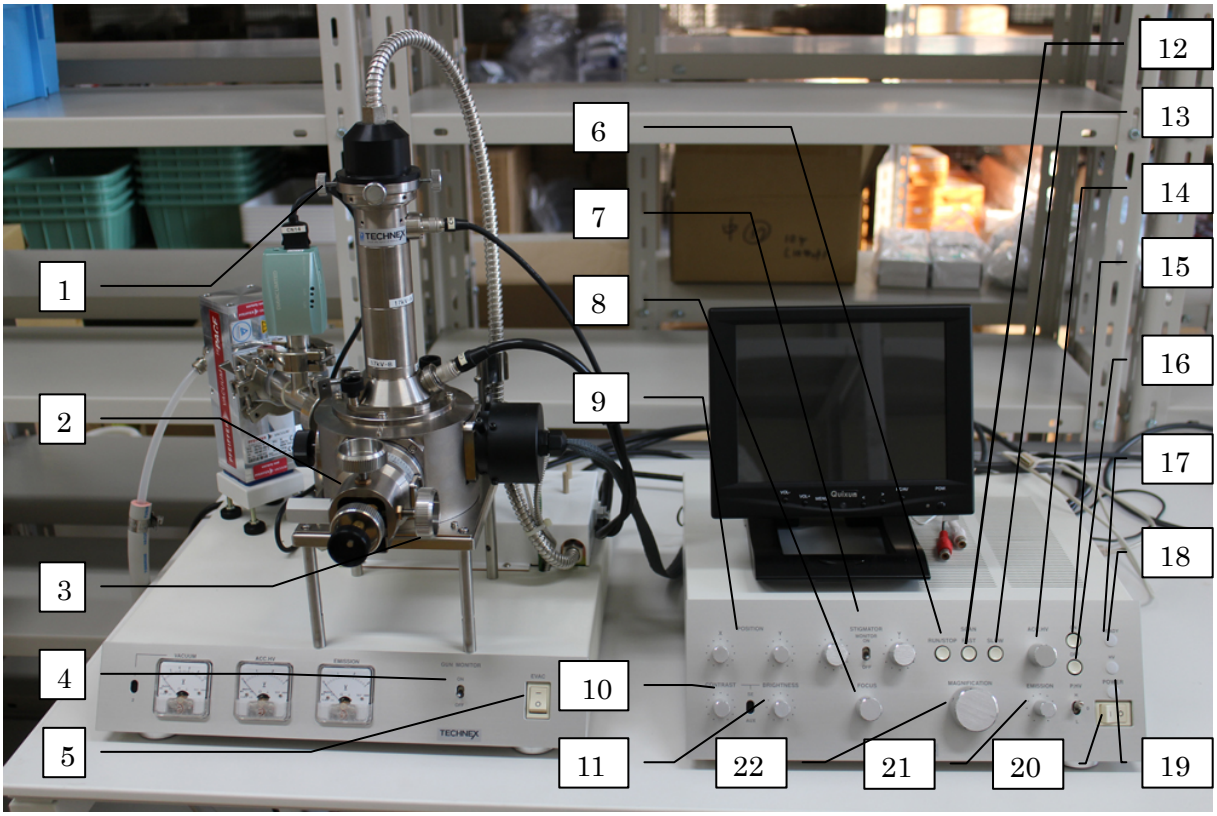

図６　Mighty-8DX 弐号機と本冊子でのスイッチ・つまみ等の番号表示

また、図６は平成 25 年 10 月に導入された弐号機で、型番は同じ Mighty-8DX ですが、多少マイナーチェンジしています。性能は壱号機とほぼ同じですが、弐号機では鏡筒下部のステージが標準から大型になり、試料の可動範囲等も変わりました。これに伴って、試料台の取り付け方が変わりました。また、モニターも小型のものに変わりました。なお、制御部や鏡筒台下のパネルも多少おしゃれになっていますが、スイッチ等の配置はほぼ同じですので、操作性も壱号機と同じです。

ここから操作手順を簡単に説明します。壱号機、弐号機ともほぼ同じです。最近の電子顕微鏡はコンピュータ制御で、各部の調節も自動的に行われますが、Mighty-8DX はほとんどマニュアル操作になります。その分、原理も判りやすいですし、自分で操作して観察した実感も湧くと思います。なお、以下の文中のスイッチやつまみ等の名称の後の番号は、図５、６、９の中の番号です。

1) 後鏡筒下のリークバルブ 3 が閉まっていることを確認して、電源スイッチ 20 をオンにします。直ぐ上の電源ランプ 19 が点灯します。

2) モニターに初期画面が現れたら、RUN ボタン 6 を押します。現れた画面から倍率ダイアル[MAGNIFICATION] 22 を回して加速電圧を選択しますが、今回の鏡筒設定で

は H17kV を選びます。

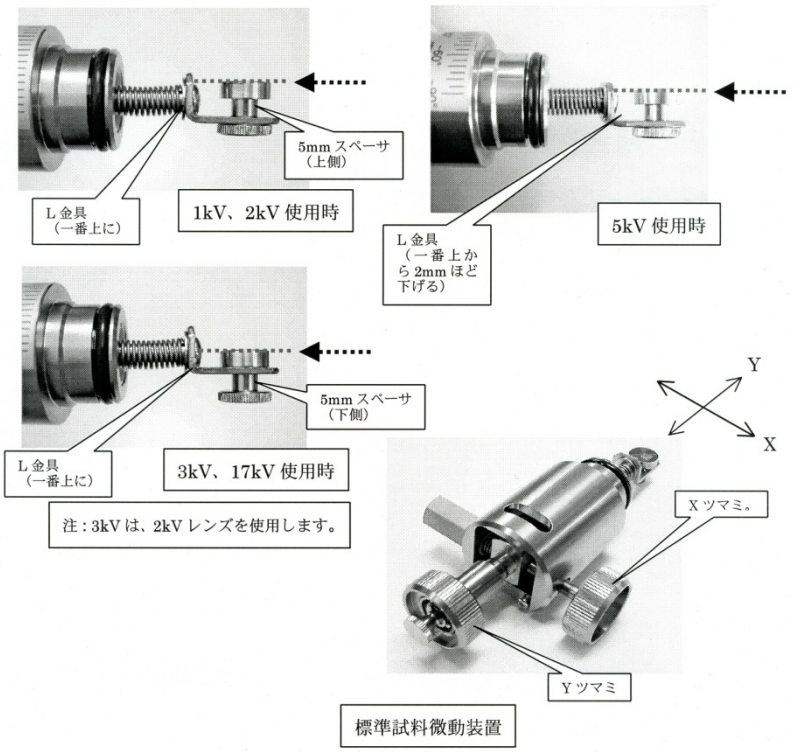

図７　壱号機標準ステージの試料台操作部と試料台の取り付け方（文献[3]より）

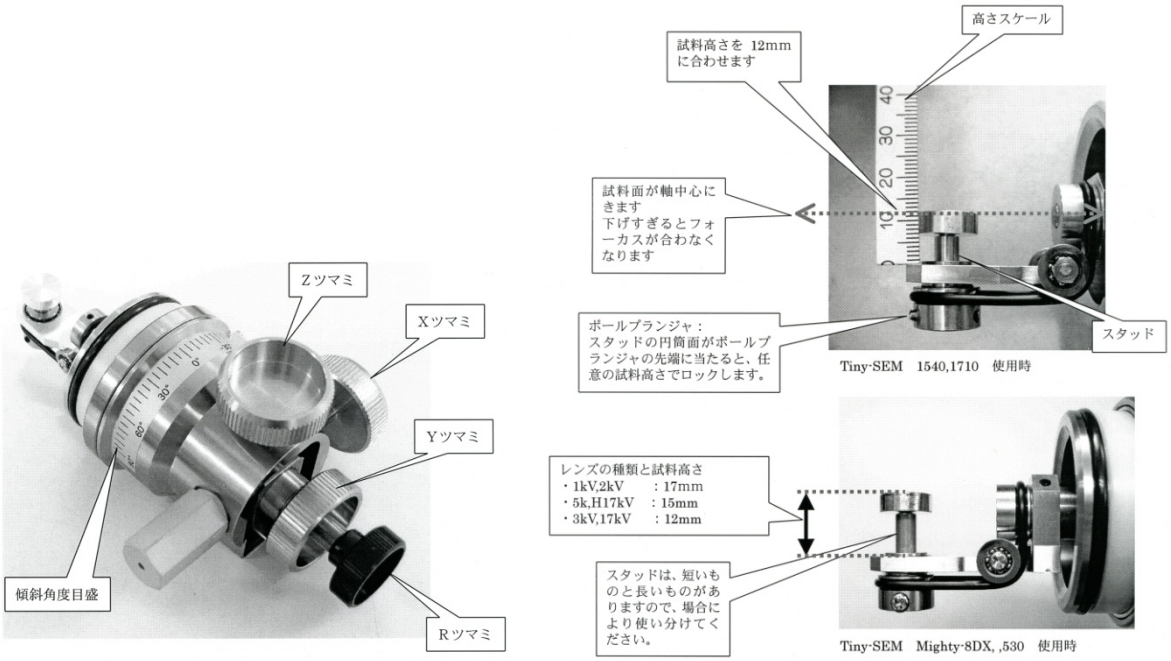

図８　弐号機大型ステージの試料台操作部と試料台の取り付け方（文献[4]より）

3) RUN ボタン 6 を押して加速電圧を確定します。数分待つと鏡筒が真空になって緑色の READY ランプ 17 が点灯します。これで準備は完了です。

4) 試料が準備できたら、鏡筒部基部の真空ポンプのスイッチ(EVAC)5をオフにします。そしてリークバルブ3を少し緩めます。分子ターボポンプの音を確認しながら、さらにリークバルブ3を少しずつ緩めて、鏡筒を大気圧に戻します。大気圧まで30秒以上かけること。また、観察直後はフィラメントが熱いので、加速電圧をoffにしてから1～2分程度待ってリークを始めて下さい。

5) 大気圧に戻ったら、試料台操作部2をゆっくりと引き抜き、机の上に置きます。壱号機では取り付けねじを緩めて試料台を取り外し、新しい試料台を取り付けます。試料台の上面を調節(今回はH17kVなので、5kVと同じ設定にする)した後、試料台の水平を確認し、試料台操作部を鏡筒にゆっくりと挿入します(図７)。弐号機では試料台をスタッドごと引き抜き、試料台からスタッドを取り外します。取り外したスタッドを新しい試料台の裏にねじ込み、試料台ホルダーの穴に挿入します。試料台ホルダーから試料台までの高さ(今回はH17kVなので15㎜)を調節し，鏡筒に試料台操作部をゆっくりと挿入します(図８)。

6) リークバルブ3を閉め、真空ポンプのスイッチ5をオンにします。READY ランプ17が点灯するのを待ってください。

7) 電子銃モニター(GUN MONITOR)のスイッチ4をオンにします。次に加速電圧(ACC.HV)の ON スイッチ 15 を押すと HV ランプ 18 が点灯しますので、加速電圧(ACC.HV)の調節つまみ14を右方向に止まるまで回します。なお、<u>このつまみはピント粗動つまみを兼ねています</u>。

8) コントラスト(CONTRAST)のつまみ10とブライトネス(BRIGHTNESS)のつまみ11を中央にセットします。SCAN FASTの押しボタン12とSCAN SLOWの押しボタン13を押して走査速度を3に合わせて下さい。倍率ダイアル(MAGNIFICATION)22を最低倍率に合わせ、モニター画面を見ながらフィラメント電流(EMISSION)の調節つまみ21をゆっくりと右に回していきます。時計になぞらえると1～2時くらいの位置でモニターに明るい領域が見えてきます。フィラメントの飽和電流を設定するために、さらに右に回して明るいスポットを小さくしますが、大きさが変化しなくなる直前に合わせてください。<u>3時より先まで回さないこと</u>。フィラメントの寿命が極端に短くなります。

9) 次にスポットが画面中央になるよう鏡筒のフィラメント位置調節ねじ1で調節してください。このねじは対角方向に４個有り、対角位置のねじを使って電子銃部を押す・引くの要領で移動させます。おおよそ中央に来たら、倍率を100倍に上げてさらに精密に合わせます。これはフィラメントの軸出しです。

☆　皆さんに操作してもらうのは、この後の観察・写真撮影です。時間があれば前半部分の操作もできるのですが、皆さんにはできるだけ観察をしてもらいたいと考えています。

10) 電子銃モニターのスイッチ[4]をオフにして下さい。何らかの画像が見えると思います。真っ白で明るすぎるようでしたら、コントラストのつまみ[10]とブライトネス[11]のつまみを少し左に回すと像が見えると思います。加速電圧調節つまみ[14]をゆっくり左方向に戻し、画像をはっきりさせます。このつまみが光学顕微鏡のピント合わせの粗動ノブに相当します。合焦点が分かりにくいときは、つまみを少し左右に回して同じ程度にピンぼけする位置の間に合わして下さい。また、コントラストのつまみ[10]とブライトネスのつまみ[11]を調節して、見易い画質にして下さい。程度は観察者の好みです。SCAN FAST の押しボタン[12]と SCAN SLOW の押しボタン[13]を押して走査速度を 3～4 に合わせて下さい。走査速度は－１から８までの 10 段階で、数値が大きくなるほど走査速度が遅くなりますが、画像はきれいになります。

11) 次に見たい視野を探します。試料台操作部[2]の手前(前後方向)と右(左右方向)のノブ(図７)を回して試料を移動させ、見たいものを画面の中央に持ってきます。弐号機の大型ステージでは、前後左右への移動の他に、上下方向の移動と試料台の回転ができるようになっています(図８)。試料台操作部[2]の一番手前の黒いノブが試料台回転で、付け根側の銀色のノブが前後方向の移動です。また、上部のノブが上下方向の移動です。そして倍率ダイアル[22]を回して見たい倍率にセットします。不必要に大きく拡大しても、かえって判りにくくなることもありますので、適当な倍率にセットして下さい。ピントがぼけるようなら、ピント微動つまみ(FOCUS)[8]を回して最も鮮明に見えるように調節します。ピント合わせの時は走査速度を-1～0 に合わせると、像は粗いですが画面更新が早くなり、合わせ易くなります。倍率も少し高めに設定してピントを合わせ、必要な倍率に戻すときれいに合います。必要に応じてコントラストやブライトネスも調節します。なお 1000 倍以上の倍率では、試料台移動ノブを使うと、動きすぎて観察場所が視野から外れてしまうことがあります。その場合は電子的に走査領域を動かすポジション (POSITION)の X と Y の調節つまみ[9]を使って視野を移動させて下さい。ただし、低倍率ではほとんど効果がありません。

12) ここは飛ばしてもかまいません。さらに画質を向上するには、非点収差(スティグマ)の調節を行います。ビーム損傷しても良く、微細構造のコントラストがはっきりした場所に視野を移動し、倍率を 5000 倍以上に設定します。SCAN FAST のスイッチ[12]を押してスキャンスピードを-1 か 0 に設定して下さい。ピント微調節つまみ[8]と非点収差調節つまみ(STIGMATOR)の X と Y のつまみ[7]を回して、像が最もはっきりするように調節します。ピント→X→Y→ピント→

X・・・と順に画質を追い込んでいきます。非点収差の影響は高倍率ほど大きくなりますが、数百倍程度の倍率ならあまり影響はありません。また、この Mighty-8DX では永久磁石のレンズを用いている関係上、一度合わせると観察途中で再調節の必要がありません。調節が終われば、SCAN SLOW のスイッチ 13 を押して、スキャンスピードを 3～4 に設定して観察して下さい。

13) 観察している場所の構造がどうなっているのか、視野をずらしたり、倍率を変えたり、コントラスト・ブライトネスを調節したりしてよく観察して下さい。撮影する場合、ほぼ画面に見えているように画像を記録することができます。

画像の撮影は本体のみでも可能ですが、印刷や USB メモリへのデータ転送ができません(記録はコンパクトフラッシュのみ)ので、接続したノートパソコンで行います。

14) 構図やピント・画質調節が終わったら、起動してあるソフト Tiny-Capture のウインドウ(図９)で、左端のメニューから画像キャプチャー(Capture)のボタン 23 を選び、クリックして下さい。およそ 100 秒かけて画像をキャプチャーします。キャプチャーが終わったら、画像に試料名などのコメントを入れることができます。24 の入力欄に半角アルファベットで入力してください。全角文字や半角カタカナは使えません。入力し終わったら 25 にチェックを入れると画像に反映されます。画像を保存するには、メニューから Save Image のボタン 26 を選び、クリックして下さい。保存のウィンドウが開きますので、ファイルに名前を付けて保存して下さい。名前を付けない場合は自動的にファイルネームが付けられますが、記録しておかないと何の画像か判らなくなります。

撮影が終わった後、モニター上に表示されている画像は静止画です。次の操作に移る前に SCAN RUN ボタン 12 を１回押して下さい。ライブ映像に切り替わります。なお、画面右下のスキャン速度の数値の右に R の文字が出ていればライブ映像です。S や数字のみの場合は静止画像等ですので、SCAN RUN ボタン 12 を押して切り替えて下さい。

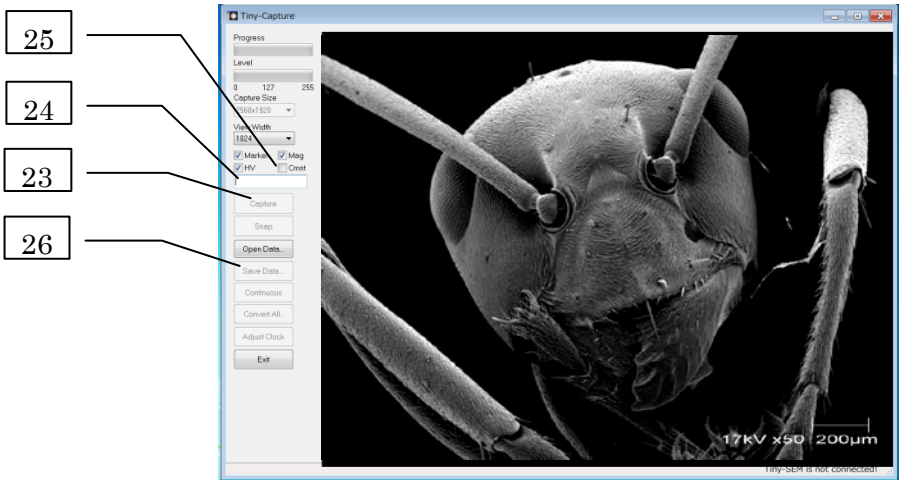

図９　Tiny-Capture の画面

15) 印刷はエクスプローラーからフォトプリンタの SELPHY へデータを送って行います。エクスプローラーでキャプチャーデータのフォルダを表示して下さい。印刷したい写真を右クリックで選択し、メニューの中から印刷を選択して下さい。写真の印刷ウィザードが起動します。「次へ」をクリックすると画像選択画面が出ますので、印刷したい画像にチェックマークが入っていることを確認して「次へ」をクリックします。印刷オプション画面が出ますので、「SELPHY CP790」が選択されていることを確認した上で、印刷の基本設定をクリックします。開いたプリンタのプロパティで用紙サイズが「CP_L サイズ 89×119mm」、印刷の向きが「横」であることを確認したら、「OK」をクリックします。印刷オプション画面に戻ったら、「次へ」をクリックします。レイアウト選択画面が出ますので、「フルページ写真プリント」を選択し、「次へ」をクリックします。印刷が開始されますが、昇華型プリンタなので、黄・赤・青・保護膜と都合４回重ねて印刷するので少し時間がかかります。

16) データを USB メモリに転送する操作は、やはりエクスプローラーから行います。エクスプローラーでキャプチャーデータのフォルダを表示したら、転送したい画像ファイルを USB メモリにドラッグして下さい。画像データはビットマップイメージ(BMP ファイル)ですので、たいていの画像ソフトで扱えると思います。なお、USB メモリを取り外す前に、必ず「ハードウェアの安全な取り外し」の操作を行って下さい。

なお、画像には倍率も表示されますが、これは特定プリンタと組み合わせた場合の倍率です。画面や今回のプリンタ(SELPHY)で印刷した結果、あるいは皆さんの自宅のパソコンで表示したりプリンタで印刷したりした結果とは一致しませんので無視して下さい。目安程度と考えて下さい。表示しないことも可能です。なお、スケールバーとそのサイズは正確ですので、大きさの基準はこちらを参考にして下さい。

17) 試料を交換したり電源を切ったりするには、まずフィラメント電流(EMISSION)のつまみ 21 を左に止まるまで回して、フィラメントに流れる電流を０にします。

18) 加速電圧(ACC.HV) 14 のつまみを左に止まるまで回します。

19) 加速電圧(ACC.HV)の OFF スイッチ 16 を押して加速電圧を切ります。試料を交換する場合は、真空ポンプのスイッチ 5 を OFF にして下さい。あとは p7 の 5)試料交換の手順の要領通りです。なお、観察直後はフィラメントが熱いので、加速電圧を OFF にしてからリークバルブ 3 をゆるめるまで 1～2 分待ってください。また、電源を切る場合は、そのまま電源スイッチ 20 を OFF にして結構です。なお、鏡筒中の試料は電源 OFF 後、鏡筒が大気圧に戻ってからでも取り出せます。

SEM 試料の作り方

SEM では試料を真空中に持ち込み、電子ビームを当てて放出される二次電子を観察します。そのため、試料には真空中でガスを放出しないこと、電子ビームでもたらされた電子をアースに流すこと、二次電子の発生効率が良いことが要求されます。

ガスを出さないためには、試料からガスの元となるものを取り除く必要があります。生物試料では水分が主たるガス放出源ですので、乾燥する必要があります。ただし、生体試料は単純に自然乾燥すると表面の微細構造が変形・破壊されることが多いため、臨界点乾燥法や凍結乾燥法などの工夫が必要です。

また、生物試料は水分を含んでいると導電性がありますが、乾燥すると導電性を失います。そのため電子ビームでもたらされた電子をアースに流すことができません。さらに、生物試料はほとんどが軽元素でできているため、二次電子の発生効率がよくありません。これらを改善するために、重金属で導電染色をしたり重金属を試料表面にコーティングしたりして、これらの問題点を回避します。

これらの生物試料作成方法はそれなりに手間暇がかかります(図１０)。しかし、試料を選べば多少手間を省略することも可能です。例えば、含水量が少なくて丈夫な植物試料や乾燥した昆虫標本、毛などの皮膚派生物などは、金属コーティングを施すだけで観察可能です。本セミナーではこれらの SEM 試料を作ります。

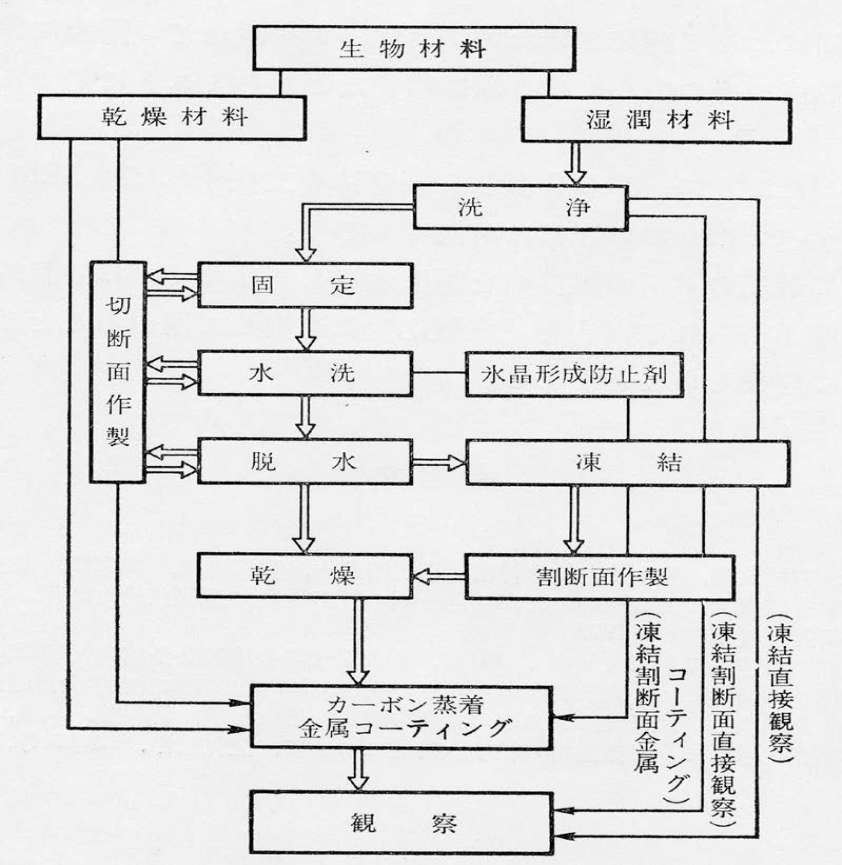

図１０　生物試料作成法の概略(文献２より)

金属コーティングすると試料の判別が困難になりますので、試料台の裏側(ネジ穴のある側)にマジックで識別記号等を記入して下さい。次に標本台(スタッブ)の上に導電性両面テープや導電性塗料などで試料を貼り付けます。木工用ボンドなどの接着剤を利用することも可能ですが、乾燥に時間がかかるので薄く塗るようにして下さい。また、Mighty-8DX では試料台の可動範囲が 10×10mm しかありませんので、大きな試料は小さく切断して下さい(弐号機では大型ステージになったため、可動範囲は 10×15mm に広がりましたが、今回は同じ試料台を用います)。塗料や接着剤を使用した場合は十分乾いてからイオンスパッタ装置にかけます。木工用ボンドが白いままだと水分が含まれていますので、減圧すると風船のように膨らみます。金属コーティングとして、ここでは金をコーティングします。試料を貼り付けた試料台をトレイにのせ、電源の入ったイオンスパッタ装置のチャンバーにセットして扉を閉めると、自動的に排気が始まります。真空度が上がり、所定の時間コーティングした後、自動的に真空ポンプが止まって、チャンバーのリークが始まります。大気圧に戻れば扉が開きますので、試料台を取り出して下さい。あとは SEM にセットするだけです。

参考文献

[1] 図説走査電子顕微鏡　田中敬一・水谷隆編　朝倉書店　1980

[2] 走査電子顕微鏡の基礎と応用　日本電子顕微鏡学会関東支部編　共立出版 1983

[3] 卓上型走査電子顕微鏡 Tiny-SEM Mighty-8DX 取扱い説明書(16C)　㈱テクネックス工房　2013(?)

[4] Tiny-SEM 用大型ステージ取扱説明書(02A)　㈱テクネックス工房　2013(?)

Ver.1.5.1　(2014.10.10 改訂)